



# UNIVERSIDAD DE CASTILLA - LA MANCHA

## GUÍA DOCENTE

### 1. DATOS GENERALES

<b>Asignatura:</b> CULTIVOS CELULARES Y CITOMETRIA DE FLUJO <b>Tipología:</b> OPTATIVA <b>Grado:</b> 2317 - MASTER UNIVERSITARIO EN BIOMEDICINA EXPERIMENTAL <b>Centro:</b> 10 - FACULTAD DE MEDICINA DE ALBACETE <b>Curso:</b> 1 <b>Lengua principal de impartición:</b> Español <b>Uso docente de otras lenguas:</b> <b>Página web:</b> <a href="https://campusvirtual.uclm.es/course/view.php?id=13513">https://campusvirtual.uclm.es/course/view.php?id=13513</a>	<b>Código:</b> 310135 <b>Créditos ECTS:</b> 6 <b>Curso académico:</b> 2021-22 <b>Grupo(s):</b> 10 <b>Duración:</b> Primer cuatrimestre <b>Segunda lengua:</b> Inglés <b>English Friendly:</b> N <b>Bilingüe:</b> N
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Profesor: **SOLEDAD CALVO MARTINEZ** - Grupo(s): 10

Edificio/Despacho	Departamento	Teléfono	Correo electrónico	Horario de tutoría
Facultad de Medicina	CIENCIAS MÉDICAS	2956	soledad.calvo@uclm.es	Solicitar previamente cita por e-mail

Profesor: **MIRIAM FERNANDEZ FERNANDEZ** - Grupo(s): 10

Edificio/Despacho	Departamento	Teléfono	Correo electrónico	Horario de tutoría
Facultad de Medicina AB/Área de Fisiología	CIENCIAS MÉDICAS	926053528	miriam.fernandez@uclm.es	Solicitar previamente cita por e-mail

Profesor: **MARÍA FRANCISCA GALINDO ANAYA** - Grupo(s): 10

Edificio/Despacho	Departamento	Teléfono	Correo electrónico	Horario de tutoría
Facultad de Farmacia 2.17	CIENCIAS MÉDICAS	967599200	maria.galindo@uclm.es	Solicitar previamente cita por e-mail

Profesor: **EVA MARÍA GALÁN MOYA** - Grupo(s): 10

Edificio/Despacho	Departamento	Teléfono	Correo electrónico	Horario de tutoría
Despacho 2.31, Facultad de Enfermería de Albacete /// CRIB, Albacete	ENFERMERÍA, FISIOTERAPIA Y TERAPIA OCUP.	926053102	EvaMaria.Galan@uclm.es	Solicitar previamente cita por e-mail

Profesor: **PEDRO ANTONIO TRANQUE GOMEZ** - Grupo(s): 10

Edificio/Despacho	Departamento	Teléfono	Correo electrónico	Horario de tutoría
Facultad de Medicina AB/Área de Fisiología	CIENCIAS MÉDICAS	2970	pedro.tranque@uclm.es	Solicitar previamente cita por e-mail

### 2. REQUISITOS PREVIOS

Los requisitos de acceso al Máster

### 3. JUSTIFICACIÓN EN EL PLAN DE ESTUDIOS, RELACIÓN CON OTRAS ASIGNATURAS Y CON LA PROFESIÓN

Los **cultivos celulares** constituyen una técnica ampliamente utilizada en el desarrollo de proyectos de investigación. Este curso permite obtener la destreza necesaria en el manejo de un amplio espectro de tipos de cultivo: líneas celulares, cultivos primarios, cultivos de tejido y cultivos de células madre. El curso brinda además la posibilidad de explorar algunos de los complementos habituales de los cultivos celulares, como son las técnicas de transfección celular, estrechamente ligadas a otras metodologías moleculares, celulares y bioquímicas que también se estudian en este máster.

La segunda parte del curso está dedicada a las **técnicas de citometría de flujo**, una herramienta de gran eficacia para el análisis de cultivos celulares y células sanguíneas. En las actividades dedicadas a la citometría el estudiante adquirirá, junto a conocimientos sobre los fundamentos de la citometría, el manejo del citómetro en aplicaciones como el análisis del ciclo celular, viabilidad celular y aplicaciones en el campo de la hematología. Por lo tanto, la citometría de flujo es valorada en muy diversos campos de la investigación biomédica y la clínica; siendo al igual que los cultivos celulares un útil complemento a muchas de las técnicas abordadas en otros cursos de este máster.

Finalmente debe resaltarse el **carácter eminentemente práctico del curso**, con un alto porcentaje de objetivos centrados en la adquisición de habilidades en el manejo de técnicas experimentales.

NOTA IMPORTANTE: Los contenidos de esta guía podrán ser objeto de modificaciones, que serán advertidas a los estudiantes, si la situación sociosanitaria debida a la pandemia lo exige. Se considerarán todas las posibilidades de docencia (presencial, semipresencial y/u "online") en función de esta situación.

### 4. COMPETENCIAS DE LA TITULACIÓN QUE LA ASIGNATURA CONTRIBUYE A ALCANZAR

#### Competencias propias de la asignatura

Código	Descripción
E08	Conocimiento de los principios en los que se basan las técnicas más usuales en investigación biomédica.
E09	Selección del modelo experimental más adecuado para el objetivo de una investigación científica.
E10	Realización de técnicas de laboratorio habituales en el campo de las ciencias biosanitarias.
G01	Que los estudiantes sepan aplicar los conocimientos adquiridos y su capacidad de resolución de problemas en entornos nuevos o poco conocidos dentro de contextos más amplios (o multidisciplinares) relacionados con la investigación biomédica.
G02	Que los estudiantes sean capaces de integrar conocimientos y enfrentarse a la complejidad de formular juicios a partir de una información que, siendo incompleta o limitada, incluya reflexiones sobre las responsabilidades sociales y éticas vinculadas a la

	aplicación de sus conocimientos y juicios.
G03	Que los estudiantes sepan comunicar sus conclusiones (y los conocimientos y razones últimas que las sustentan) a públicos especializados y no especializados de un modo claro y sin ambigüedades.
G04	Que los estudiantes posean las habilidades de aprendizaje que les permitan continuar estudiando de un modo que habrá de ser en gran medida autodirigido o autónomo.
G06	Que los estudiantes sepan comprender e interpretar críticamente documentos y seminarios científicos en español y en inglés.
G07	Que los estudiantes sean capaces de redactar memorias escritas del trabajo realizado y de exponerlas y defenderlas en público.
M051	Obtener una visión general y comparada de los distintos tipos de cultivos celulares como modelos experimentales en investigación biomédica.
M052	Comprender y adquirir destreza en las técnicas para valorar la viabilidad celular de los cultivos.
M053	Comprender y adquirir destreza en las técnicas de expresión génica por transfección en cultivos celulares.
M054	Conocer las aplicaciones específicas de los cultivos de líneas celulares, cultivos primarios, cultivos de tejidos y órganos, y cultivos de células madre en el ámbito de la experimentación en biomedicina.
M055	Ser capaz de establecer y mantener cultivos de líneas celulares, cultivos primarios, cultivos de tejidos y órganos y cultivos de células madre.
M056	Conocer los fundamentos teóricos y las aplicaciones de la citometría de flujo.
M057	Ser capaz de procesar células, adquirir datos y analizar resultados mediante citometría de flujo.
M058	Adquirir destreza en las aplicaciones de la citometría de flujo al análisis de la viabilidad celular, la medición de fagocitosis, la valoración del estrés oxidativo y la oncohematología.

## 5. OBJETIVOS O RESULTADOS DE APRENDIZAJE ESPERADOS

### Resultados de aprendizaje propios de la asignatura

No se han establecido.

### Resultados adicionales

- Conocer las aplicaciones de los cultivos celulares y de la citometría de flujo a distintos campos de la experimentación biomédica.
- Comprender el alcance de la citometría para diagnóstico de patologías sanguíneas.
- Realizar una exposición oral y posterior discusión en grupo de un trabajo sobre cultivos celulares.
- Intercambiar los métodos y resultados de las prácticas de citometría de flujo.
- Buscar información bibliográfica para la elaboración de un trabajo sobre cultivos celulares.
- Configurar parámetros de citometría de flujo específicos de cada aplicación accediendo a información disponible en Internet.
- Analizar la documentación bibliográfica asociada al curso.
- Comprender la exposición de comunicaciones orales relacionadas con cultivos y con la citometría de flujo, ambas impartidas tanto por profesores como alumnos.
- Elaborar y exponer un trabajo bibliográfico sobre cultivos celulares.
- Conocer los principios básicos de los cultivos celulares y los fundamentos teóricos de la citometría de flujo.
- Aprender la utilidad de los cultivos celulares y de la citometría de flujo en distintos modelos de experimentación.
- Adquirir destreza en el manejo práctico de cada una de las aplicaciones de los cultivos celulares y de la citometría de flujo que se abordan en este curso.
- Descifrar las ventajas y limitaciones de cada sistema de cultivo estudiado para la consecución de objetivos experimentales concretos.
- Contrastar los valores de viabilidad celular obtenidos por varios métodos complementarios.
- Aprovechar el potencial que presenta la aplicación de técnicas de transfección para manipular la expresión génica en cultivos celulares.
- Elegir el método de cultivo más adecuado en función de sus aplicaciones al diagnóstico clínico o la investigación en biomedicina.
- Poner en práctica las metodologías para la obtención de cada tipo de cultivo.
- Poder explicar la fluidica, la óptica y el procesamiento informático de los datos obtenidos por citometría de flujo; y contar con la formación necesaria para entender el enorme potencial de esta técnica en el campo de las ciencias biomédicas.
- Manejar un citómetro de flujo, realizando todos los procesos desde la preparación de las muestras hasta la adquisición y el análisis de datos.
- Practicar protocolos de citometría de flujo específicos para el análisis de la viabilidad celular, la medición de fagocitosis, la valoración del estrés oxidativo y las aplicaciones oncohematológicas.

## 6. TEMARIO

### Tema 1: Técnicas de cultivo celular

**Tema 1.1** Introducción a los cultivos celulares

**Tema 1.2** Cultivos de líneas celulares

**Tema 1.3** Cultivos primarios

**Tema 1.4** Técnicas de viabilidad y transfección asociadas a los cultivos celulares

**Tema 1.5** Técnicas in vitro de migración e invasión celular

### Tema 2: Citometría de flujo

**Tema 2.1** Manejo básico del citómetro

**Tema 2.2** Análisis de marcadores leucocitarios

**Tema 2.3** Análisis del Ciclo celular

**Tema 2.4** Análisis de la Viabilidad celular

**Tema 2.5** Aplicaciones oncohematológicas

**Tema 2.6** Investigación Clínica

## 7. ACTIVIDADES O BLOQUES DE ACTIVIDAD Y METODOLOGÍA

Actividad formativa	Metodología	Competencias relacionadas (para títulos anteriores a RD 822/2021)	ECTS	Horas	Ev	Ob	Descripción
Enseñanza presencial (Teoría) [PRESENCIAL]	Aprendizaje cooperativo/colaborativo	E08 E09 G01 G02 G06 M051	0.14	3.5	S	N	Introducción al curso y a las técnicas de cultivo celular, transfección y viabilidad.
Enseñanza presencial (Prácticas) [PRESENCIAL]	Prácticas	E09 E10 G01 G02 G03 G04 M052 M053 M054 M055	0.42	10.5	S	S	Práctica de cultivos de líneas celulares, transfección génica y valoración de viabilidad en cultivos celulares
Otra actividad presencial [PRESENCIAL]	Trabajo dirigido o tutorizado	E08 E09 G01 G02 G04 G06 G07 M051	0.12	3	S	N	Reunión de grupo en presencia de tutor para la preparación de un trabajo sobre cultivos celulares
Enseñanza presencial (Prácticas) [PRESENCIAL]	Prácticas	E09 E10 G01 G02 G03 G04 M054 M055	0.14	3.5	S	N	Técnicas in vitro de migración e invasión celular
Enseñanza presencial (Prácticas) [PRESENCIAL]	Prácticas	E09 E10 G01 G02 G03 G04 M054 M055	0.14	3.5	S	N	Cultivos primarios de astrocitos corticales
Elaboración de informes o trabajos [AUTÓNOMA]	Aprendizaje cooperativo/colaborativo	E08 E09 G01 G02 G04 G06 G07 M051	0.8	20	S	N	Preparación de un trabajo sobre un tema específico de cultivos celulares
Enseñanza presencial (Prácticas) [PRESENCIAL]	Prácticas	E08 E09 G01 G02 G04 G06 G07 M056 M057	0.09	2.25	S	S	Manejo básico del citómetro de flujo
Enseñanza presencial (Prácticas) [PRESENCIAL]	Prácticas	G01 G02 G03 G04	0.08	2	S	S	Análisis de marcadores leucocitarios
Enseñanza presencial (Prácticas) [PRESENCIAL]	Prácticas	E09 E10 G01 G02 G03 G04 M058	0.14	3.5	S	N	Citometría para evaluar el ciclo celular
Enseñanza presencial (Prácticas) [PRESENCIAL]	Prácticas	E09 E10 G01 G02 G03 G04 M058	0.14	3.5	S	N	Citometría para evaluar la viabilidad celular
Enseñanza presencial (Prácticas) [PRESENCIAL]	Prácticas	E09 E10 G01 G02 G03 G04 M058	0.14	3.5	S	N	Citometría oncohematológica
Enseñanza presencial (Prácticas) [PRESENCIAL]	Prácticas	E09 E10 G01 G02 G03 G04 G06 G07	0.14	3.5	S	N	Citometría para evaluar marcadores relacionados con la investigación clínica
Pruebas on-line [AUTÓNOMA]	Resolución de ejercicios y problemas	G01 G02 G03 G04 G06	0.12	3	S	N	Resolución de cuestionarios
Foros y debates on-line [AUTÓNOMA]	Foros virtuales	G01 G02 G03 G04 G06 M051 M056	0.03	0.75	S	N	Uso de la plataforma informática en "moodle" para realizar consultas, discutir dudas e intercambiar información
Presentación de trabajos o temas [PRESENCIAL]	Método expositivo/Lección magistral	G03 G07 M051	0.12	3	S	S	Exposición de un trabajo sobre cultivos celulares y/o citometría de flujo
Prueba final [PRESENCIAL]	Pruebas de evaluación	G01 G02 G04	0.04	1	S	S	Examen tipo "pregunta de elección múltiple"
Estudio o preparación de pruebas [AUTÓNOMA]	Autoaprendizaje	G01 G02 G04 G06	3.2	80	S	N	Estudio de los recursos docentes
<b>Total:</b>			<b>6</b>	<b>150</b>			
<b>Créditos totales de trabajo presencial: 1.85</b>			<b>Horas totales de trabajo presencial: 46.25</b>				
<b>Créditos totales de trabajo autónomo: 4.15</b>			<b>Horas totales de trabajo autónomo: 103.75</b>				

Ev: Actividad formativa evaluable

Ob: Actividad formativa de superación obligatoria (Será imprescindible su superación tanto en evaluación continua como no continua)

## 8. CRITERIOS DE EVALUACIÓN Y VALORACIONES

Sistema de evaluación	Evaluación continua	Evaluación no continua*	Descripción
Presentación oral de temas	20.00%	20.00%	Se evalúa la presentación de un trabajo relacionado con los cultivos celulares y/o citometría de flujo elegido por el alumno y realizado de manera individual o en grupo.
Prueba final	40.00%	40.00%	Se evalúa mediante un examen escrito tipo "test de respuesta múltiple" los conocimientos adquiridos, en el que el número de preguntas por actividad es proporcional al tiempo dedicado durante el curso.
Valoración de la participación con aprovechamiento en clase	40.00%	40.00%	Se valora el grado de implicación del alumno en las sesiones prácticas, actividades presenciales, y en los ejercicios y foros realizados mediante plataformas virtuales.
<b>Total:</b>	<b>100.00%</b>	<b>100.00%</b>	

\* En **Evaluación no continua** se deben definir los porcentajes de evaluación según lo dispuesto en el art. 4 del Reglamento de Evaluación del Estudiante de la

UCLM, que establece que debe facilitarse a los estudiantes que no puedan asistir regularmente a las actividades formativas presenciales la superación de la asignatura, teniendo derecho (art. 12.2) a ser calificado globalmente, en 2 convocatorias anuales por asignatura, una ordinaria y otra extraordinaria (evaluándose el 100% de las competencias).

#### Criterios de evaluación de la convocatoria ordinaria:

##### Evaluación continua:

Para aprobar la asignatura en esta convocatoria será necesario haber realizado todas las actividades de carácter obligatorio, y haber acumulado un 50% de los puntos totales.

La calificación final será la suma de los puntos obtenidos en:

- La valoración de la participación con aprovechamiento del estudiante, que suma hasta 40 puntos.
- La presentación oral de un trabajo que suma hasta 20 puntos.
- Una prueba final que suma hasta 40 puntos.

NOTA: Los contenidos de esta guía podrán ser objeto de modificaciones, que serán advertidas a los estudiantes, si la situación sociosanitaria debida a la pandemia lo exige. Se considerarán todas las posibilidades de docencia (presencial, semipresencial y/u "on line") en función de esta situación.

##### Evaluación no continua:

- Para aprobar la asignatura en esta convocatoria será necesario haber realizado todas las actividades de carácter obligatorio, y haber acumulado un 50% de los puntos totales.
- Para evaluar la participación se pedirán trabajos o actividades relacionadas con la asignatura.
- La presentación oral de un trabajo y la prueba final serán comunes a la evaluación continua.

#### Particularidades de la convocatoria extraordinaria:

Aquellos alumnos que no hayan alcanzado la puntuación mínima (50 puntos) en la convocatoria ordinaria, deberán volver a evaluarse en la convocatoria extraordinaria. Esta convocatoria consistirá en un examen escrito de los contenidos teóricos y prácticos de la asignatura, con preguntas de elección múltiple tipo PEM, que supondrá el 60% de la nota final. La puntuación de la participación y aprovechamiento en clase (hasta un 40%) será la obtenida durante la convocatoria ordinaria.

La obtención acumulativa de un 50% de los puntos totales dará lugar al aprobado.

#### Particularidades de la convocatoria especial de finalización:

Se seguirán los mismos criterios que para la convocatoria extraordinaria y podrá ser utilizada por los estudiantes que se encuentren en los supuestos que se indican en el Reglamento de Evaluación del Estudiante que esté en vigor.

9. SECUENCIA DE TRABAJO, CALENDARIO, HITOS IMPORTANTES E INVERSIÓN TEMPORAL	
<b>No asignables a temas</b>	
<b>Horas</b>	<b>Suma horas</b>
Foros y debates on-line [AUTÓNOMA][Foros virtuales]	3
Prueba final [PRESENCIAL][Pruebas de evaluación]	1
Estudio o preparación de pruebas [AUTÓNOMA][Autoaprendizaje]	84.25
<b>Tema 1 (de 2): Técnicas de cultivo celular</b>	
<b>Actividades formativas</b>	<b>Horas</b>
Enseñanza presencial (Teoría) [PRESENCIAL][Aprendizaje cooperativo/colaborativo]	3.5
Enseñanza presencial (Prácticas) [PRESENCIAL][Prácticas]	10.5
Otra actividad presencial [PRESENCIAL][Trabajo dirigido o tutorizado]	3
Enseñanza presencial (Prácticas) [PRESENCIAL][Prácticas]	3.5
Enseñanza presencial (Prácticas) [PRESENCIAL][Prácticas]	3.5
Elaboración de informes o trabajos [AUTÓNOMA][Aprendizaje cooperativo/colaborativo]	20
Presentación de trabajos o temas [PRESENCIAL][Método expositivo/Lección magistral]	3
<b>Periodo temporal:</b> 9 días lectivos	
Grupo 10:	
<b>Inicio del tema:</b> 28/02/2019	<b>Fin del tema:</b> 09/03/2019
<b>Tema 2 (de 2): Citometría de flujo</b>	
<b>Actividades formativas</b>	<b>Horas</b>
Enseñanza presencial (Prácticas) [PRESENCIAL][Prácticas]	2.25
Enseñanza presencial (Prácticas) [PRESENCIAL][Prácticas]	2
Enseñanza presencial (Prácticas) [PRESENCIAL][Prácticas]	3.5
Enseñanza presencial (Prácticas) [PRESENCIAL][Prácticas]	3.5
Enseñanza presencial (Prácticas) [PRESENCIAL][Prácticas]	3.5
<b>Periodo temporal:</b> 6 días lectivos	
Grupo 10:	
<b>Inicio del tema:</b> 10/03/2019	<b>Fin del tema:</b> 20/03/2019
<b>Actividad global</b>	
<b>Actividades formativas</b>	<b>Suma horas</b>
Enseñanza presencial (Teoría) [PRESENCIAL][Aprendizaje cooperativo/colaborativo]	3.5
Enseñanza presencial (Prácticas) [PRESENCIAL][Prácticas]	10.5
Otra actividad presencial [PRESENCIAL][Trabajo dirigido o tutorizado]	3
Enseñanza presencial (Prácticas) [PRESENCIAL][Prácticas]	3.5
Enseñanza presencial (Prácticas) [PRESENCIAL][Prácticas]	3.5
Elaboración de informes o trabajos [AUTÓNOMA][Aprendizaje cooperativo/colaborativo]	20
Enseñanza presencial (Prácticas) [PRESENCIAL][Prácticas]	2.25
Enseñanza presencial (Prácticas) [PRESENCIAL][Prácticas]	2
Enseñanza presencial (Prácticas) [PRESENCIAL][Prácticas]	3.5
Enseñanza presencial (Prácticas) [PRESENCIAL][Prácticas]	3.5
Enseñanza presencial (Prácticas) [PRESENCIAL][Prácticas]	3.5
Foros y debates on-line [AUTÓNOMA][Foros virtuales]	3
Presentación de trabajos o temas [PRESENCIAL][Método expositivo/Lección magistral]	3

10. BIBLIOGRAFÍA, RECURSOS						
Autor/es	Título/Enlace Web	Editorial	Población	ISBN	Año	Descripción
C. Ramírez-Castillejo y col.	Pigment-epithelium derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal				2006	
Freshney, R.I	Culture of animal cells. A manual of basic technique.	Ed Wiley & Sons, Inc, New Jersey			2005	
G. Banker, K Goslim	Culturing Nerve Cells	The Massachusetts Institute of Technology, Cambridge			2002	
Gähwiler, B.H., M. Capogna, D. Debanne, R.A. McKinney and S.M. Thompson	Organotypic slice cultures: a technique has come of age					
Howard M. Shapiro	Practical Flow Cytometry.	Wiley-Liss		0471411256	2003	
Itasaki, N. , S. Bel-Vialar, R. Krumlauf.	¿Shocking¿ developments in chick embryology: electroporation and in ovo gene expression.					
James V. Watson	Flow Cytometry Data Analysis : Basic Concepts and Statistics	Cambridge University Press		0521019702	2005	
Martin J. Stoddart	Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)	Humana Press		1617791075	2011	
S. Chiba	Notch Signaling in Stem Cell Systems				2006	
T. Reya y col.	Stem cells, cancer, and cancer stem cells				2001	
Teresa S. Hawley, Robert G. Hawley.	Flow Cytometry Protocols (Methods in Molecular Biology)	Humana Press		1588292355	2004	
Theodore Friedmann and John Rossi	Gene Transfer: Delivery and Expression of DNA and RNA, A Laboratory Manual	Cold Spring Harbor Laboratory Press,U.S.		9780879697655	2007	
William C. Heiser	Gene Delivery to Mammalian Cells. Volume 1: Nonviral Gene Transfer Techniques (Methods in Molecular Biology)	Humana Press		9781588290861	2003	
William C. Heiser	Gene Delivery to Mammalian Cells. Volume 2: Viral Gene Transfer Techniques (Methods in Molecular Biology)	Humana Press		9781588290953	2003	
	Introduction to Cell Culture <a href="https://www.thermofisher.com/es/es/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html">https://www.thermofisher.com/es/es/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html</a> Flow cytometry basics <a href="https://www.miltenyibiotec.com/ES-en/resources/mac3-handbook/mac3-technologies/flow-cytometry/flow-cytometry-basics.html">https://www.miltenyibiotec.com/ES-en/resources/mac3-handbook/mac3-technologies/flow-cytometry/flow-cytometry-basics.html</a>					
Alice, Longobardi, Givan	Flow Cytometry: First Principles	John Wiley & Sons, Inc.			2004	